

**University of Groningen**

## **Peroxisome homeostasis and ageing in yeast**

Kawalek, Adam

**IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.**

*Document Version*

Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*

2015

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*

Kawalek, A. (2015). *Peroxisome homeostasis and ageing in yeast*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. [S.n.].

### **Copyright**

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

### **Take-down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

*Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.*

## **Samenvatting**

### **Peroxisoom homeostase en veroudering in gist**

Alle levende organismen verouderen en sterven. Bij de mens hangt veroudering samen met negatieve fysieke, psychologische en sociale veranderingen en een verhoogd risico op leeftijd-gerelateerde ziektes. De strijd tegen de gevolgen van veroudering is daarom één van de grootste uitdagingen voor onze samenleving. Om de nadelige effecten van veroudering tegen te kunnen gaan is een goed begrip van dit proces op cellulair niveau noodzakelijk.

Het onderzoek naar veroudering bij primaten wordt bemoeilijkt door hun relatief lange levensduur. Zelfs kleinere model organismen, zoals muizen, kunnen nog drie jaar worden. Gisten, vliegen of wormen, zijn met hun veel kortere levensduur aantrekkelijker modelorganismen en worden daarom veelvuldig gebruikt voor studies naar de moleculaire mechanismen die ten grondslag liggen aan veroudering. Gisten worden ook veelvuldig gebruikt in onderzoek naar veroudering. Door gebruik te maken van deze ééncellige organismen, kunnen we op het niveau van één cel kijken. In vergelijking met multicellulaire organismen maakt dit het onderzoek naar veroudering minder complex. Omdat veel processen geconserveerd zijn in gist en hogere eukaryoten, kan onderzoek aan gist bijdragen aan kennis over veroudering in hogere eukaryoten, inclusief de mens.

In gist gaat veroudering samen met metabole en niet-metabole veranderingen die zich manifesteren door toenemende schade aan belangrijke macro-moleculen zoals eiwitten en DNA. Uiteindelijk gaat de cel hieraan dood. We onderscheiden twee soorten veroudering in gist: replicatieve en chronologische veroudering. De replicatieve levensduur wordt bepaald door het aantal dochtercellen die een moedercel kan produceren. De chronologische levensduur is de tijd die een niet delende gistcel kan overleven in stationaire batch cultures. Het is bekend dat mitochondriën een centrale rol spelen in beide vormen van veroudering door hun rol bij het energiemetabolisme en de vorming van zuurstofradicalen (ROS). Andere organellen, bijvoorbeeld peroxisomen, bevatten ook enzymen die deze potentieel gevaarlijke moleculen produceren. De laatste jaren zijn ook positieve effecten van ROS gevonden. In lage

## *Samenvatting*

concentraties vormen deze stoffen belangrijke signaalmoleculen in stress-response. Peroxisomen bevatten naast ROS producerende enzymen ook antioxidant enzymen die ROS onschadelijk maken. Hiermee wordt schade aan de cel en het peroxisoom voorkomen. Het onderzoek beschreven in dit proefschrift is gericht op veroudering in gist, met de nadruk op de rol van peroxisomen en het belang van peroxisoom homeostase.

**Hoofdstuk 1** geeft een literatuur overzicht over onderzoek waarbij gisten worden gebruikt als modelorganismen in onderzoek naar veroudering. De levensduur van gist hangt sterk af van omgevingsfactoren, zoals bijvoorbeeld de samenstelling van het kweek medium, maar wordt ook bepaald door genetische factoren. In gist is het meest bekend over genetische factoren die een rol spelen in het reguleren van het metabolisme. Dit geeft aan hoe belangrijk groeicondities zijn voor de levensduur. Op subcellulair niveau zien we veroudering aan het verval van celcomponenten en, daarmee samenhangend, functieverlies van organellen. We zien dit vooral bij mitochondriën omdat zowel chronologische als replicatieve veroudering leiden tot ophoping van beschadigde mitochondriën en een toenemende productie van ROS. Minder duidelijk is de rol van peroxisomen, een ander ROS producerend cel organel. Peroxisomen zijn organellen die een enzym rijke matrix bevatten die omgeven wordt door een enkele membraan. Ze zijn aanwezig in bijna alle eukaryote cellen en bevatten enzymen voor verschillende metabole routes, zoals  $\beta$ -oxidatie van vetzuren en het metabolisme van waterstofperoxide ( $H_2O_2$ ).

Alle peroxisomale enzymen worden gecodeerd door genen in de kern en gesynthetiseerd in het cytosol. Er zijn aanwijzingen dat de efficiëntie van matrixeiwit import afneemt tijdens celveroudering. Dit is met name aangetoond voor katalase, een antioxidant enzym dat  $H_2O_2$  neutraliseert. Dit leidt tot een toename van ROS in de peroxisomen en bijkomende schade aan de peroxisomale inhoud. Uiteindelijk wordt de efficiëntie van metabole reacties verminderd doordat ook enzymen beschadigd raken. Cellen bevatten verschillende mechanismen om allerlei vormen van schade in de cel te verwijderen of te herstellen (housekeeping). Housekeeping van peroxisomale eiwitten omvat het verwijderen van oude en de aanmaak van nieuwe eiwitten. Recent ontwikkelingen in de kennis over peroxisomen en housekeeping zijn samengevat in

**Hoofdstuk 2.** Bij deze processen zijn eiwitcomplexen betrokken die zowel voor als na import

in het organel werken, zoals moleculaire chaperones, een peroxisomaal LON protease en het ubiquitine-proteasoom systeem. Ook kunnen beschadigde organellen in hun geheel worden afgebroken door autofagie (pexofagie). Samen zorgen deze mechanismen ervoor dat metabole reacties en eiwit import in het peroxisoom efficiënt blijven werken. Functievermindering van organellen door veroudering wordt zo voorkomen en het verouderingsproces vertraagd.

De levensduur van een organisme hangt af van omgevingsfactoren zoals het dieet. Er wordt beweerd dat calorierestrictie (CR) de levensduur van verschillende organismen, ook gist, verlengt. In micro-organismen kan de impact van CR worden onderzocht door de concentratie van de koolstofbron in het medium te verlagen. Onderzoek naar de positieve effecten van CR op de levensduur van gist is voornamelijk gedaan in bakkersgist (*S. cerevisiae*), waarbij glucose werd gebruikt als koolstofbron. Om te analyseren of CR ook de levensduur van andere gistsoorten verlengt en of wijzigingen in concentraties van andere koolstofbronnen de levensduur ook beïnvloedt, onderzochten we de relatie tussen het type koolstofbron en chronologische levensduur in de gist *H. polymorpha* (glucose, glycerol, methanol, ethanol). Wanneer glycerol werd gebruikt, nam de levensduur van *H. polymorpha* toe wanneer lagere concentraties werden toegevoegd aan het medium. Bij het gebruik van glucose, ethanol of methanol, leidde concentratieverlaging juist tot verkorting van de levensduur. Dit betekent dat calorierestrictie niet altijd leidt tot een langere levensduur in gist.

De langere levensduur van *S. cerevisiae* bij lagere glucose concentraties kan worden verklaard door een verminderde uitscheiding van azijnzuur. Azijnzuur is toxisch voor cellen bij een lage pH. Een vergelijkbaar fenomeen treedt op bij *H. polymorpha*. Het onderzoek wees uit dat externe factoren ook een rol spelen bij het bepalen van verschil in levensduur bij groei op hoge en lage concentraties koolstofbronnen. Wanneer *H. polymorpha* werd gekweekt op glycerol was er geen azijnzuur meetbaar in het medium. De aanwezigheid van azijnzuur kan daarom geen verklaring zijn. Daarbij komt dat azijnzuur wel werd uitgescheiden in medium wanneer de gist werd gekweekt op media met hoge concentraties glucose; condities waarbij de levensduur juist werd verlengd. De secretie van azijnzuur correleert dus niet met het effect van calorierestrictie wanneer de gist werd gekweekt op glycerol of glucose.

## Samenvatting

Groei op hoge concentraties glycerol of glucose leidt tot sterke verzuring van het medium. Een lage medium pH bleek voldoende te zijn om de levensduur van stationaire gist cellen te verkorten, onafhankelijk van uitgescheiden producten zoals azijnzuur. Het bufferen van het kweek medium had een positief effect op de levensduur van cellen die op glycerol werden gekweekt. Dit gold in mindere mate voor glucose gekweekte cellen. Op grond hiervan concludeerden we dat afname van de pH van het medium tijdens groei en de resistentie van de cellen tegen lage pH belangrijke factoren zijn die de levensduur van gist mede bepalen. Deze conclusie werd versterkt door het feit dat de cellen die op relatief hoge concentraties glucose waren gekweekt beter bestand waren tegen lage pH. Ook vertoonden ze een verhoging in de zogenaamde cell cycle arrest in vergelijking met cellen die gekweekt waren op een relatief lage concentratie glucose of glycerol. Deze resultaten suggereren ook dat in cellen die gekweekt zijn op een hoge concentratie glucose een aanpassing plaatsvindt tijdens de groeifase waardoor ze beter bestand zijn tegen de impact van lage pH tijdens de stationaire fase.

Samenvattend duiden onze resultaten erop dat de chronologische levensduur van gist afhangt van de samenstelling van medium, waarbij verzuring van het medium én resistentie tegen lage pH belangrijke factoren zijn. Deze effecten moeten in acht worden genomen wanneer de resultaten van de analyse van de levensduur in gistmutanten worden geïnterpreteerd.

In **Hoofdstuk 4** en **Hoofdstuk 5** worden studies beschreven naar het effect van de deletie van twee genen die coderen voor peroxisomale antioxidant enzymen: katalase en het peroxiredoxine PMP20.

*H. polymorpha* kan groeien op media met methylamine als stikstofbron. Methylamine wordt geoxideerd door het peroxisomale enzym amine oxidase. De levensduur van katalase-deficiënte (*cat*) *H. polymorpha* cellen op media met methylamine als stikstofbron bleek korter te zijn dan die van wild-type controle cellen. Tegelijkertijd werd waargenomen dat, hoewel wild-type en *cat* cellen evenveel amine oxidase eiwit bevatten, er minder amine oxidase activiteit aanwezig was in de mutante cellen. Dit suggereert dat katalase belangrijk is om peroxisomale eiwitten te beschermen tegen inactivatie door beschadigingen/oxidatie die veroorzaakt worden door H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Wanneer *H. polymorpha* wordt gekweekt op methanol, wordt deze koolstofbron initieel geoxideerd door het peroxisomale enzyme alcohol oxidase. Groei van *cat*-cellen op een mengsel van glycerol en methanol leidde initieel tot toename van H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-productie en een verlenging van de chronologische levensduur ten opzichte van wild-type cellen. Verder onderzoek wees uit dat in *cat*-cellen, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> afkomstig van het methanol metabolisme, een Yap-1 afhankelijke inductie van cytochroom c peroxidase veroorzaakte. Cytochroom c peroxidase is cruciaal voor de neutralisatie van H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in *cat* cellen. Onze resultaten duiden erop dat H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gevormd in het peroxisoom buiten het organel effect kan hebben als het niet in het organel wordt geneutraliseerd. Sterker nog, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> geproduceerd in het peroxisoom kan als signaalmolecuul fungeren en zo de levensduur van cellen verlengen.

Evenals de *cat*-deficiënte cellen bleken cellen die het peroxisomale peroxiredoxin Pmp20 missen een langere levensduur te hebben wanneer de cellen werden gekweekt op medium dat een mengsel bevat van methanol en glycerol (**Hoofdstuk 5**). Eerdere *in vitro* data lieten zien dat H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> efficiënt door Pmp20 kan worden geneutraliseerd. In tegenstelling tot wat werd gevonden in *cat* cellen werden er in *pmp20* cellen geen verhoogde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> niveaus gemeten tijdens de groeifase. Ook ging de langere levensduur van *pmp20*-cellen niet gepaard met een toename van andere antioxidant enzymen zoals katalase. Hieruit hebben we geconcludeerd dat de toegenomen levensduur van *pmp20*-cellen niet wordt veroorzaakt door de inductie van H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-gerelateerde stress-eiwitten.

In **Hoofdstuk 6** is onderzoek beschreven naar de functie van non-bilayer lipiden in de peroxisomale membraan. De peroxisomale matrix is gescheiden van de rest van de cel door een lipide dubbellaag. Uit recent onderzoek is gebleken dat deze membraan significante hoeveelheden cardiolipine (CL) en fosfatidylethanolamine (PE) bevat. Deze zogenaamde non-bilayer lipiden hebben de vorm van een omgekeerde kegel. Deze unieke vorm is belangrijk voor membraanfusie, de assemblage van membraaneiwitcomplexen en de interactie van perifere eiwitten met membranen. Om de functie van deze lipiden te bestuderen werden gistmutanten gemaakt die geen of verminderde hoeveelheden CL of PE konden synthetiseren. Zowel in *Saccharomyces cerevisiae* als in *H. polymorpha* werd geen effect op peroxisomale eiwit import

## Samenvatting

of deling van peroxisomen waargenomen wanneer *CRDI*, het gen dat codeert voor cardiolipine synthase, was gedeleteerd. Peroxisoom kwantificaties van *S. cerevisiae* stammen met een deletie in één of meerdere PE-biosyntheseroutes wezen uit dat bij verlaagde PE-biosynthese het aantal peroxisomen per cel afneemt. PE is een precursor voor phosphatidylcholine (PC) synthese. Daarom heeft een afname in de synthese van PE indirect ook effect op de cellulaire PC niveaus. Dit indirecte effect op de synthese van PC kan teniet worden gedaan door choline aan het medium toe te voegen, omdat er dan een alternatieve route is om PC te maken, die onafhankelijk is van PE. Toen de mutanten werden gekweekt in media waaraan choline was toegevoegd, was er geen effect meer op peroxisoom biogenese of het aantal peroxisomen. Op grond van deze uitkomsten is het waarschijnlijk dat de waargenomen effecten het indirecte gevolg waren van de verminderde synthese van PC, maar niet van PE. Dit duidt erop dat non-bilayer fosfolipiden geen grote rol spelen in de biogenese en proliferatie van peroxisomen.

## Conclusies en toekomstperspectief

Het onderzoek dat is beschreven in dit proefschrift toont aan dat de chronologische levensduur van gistcellen sterk afhangt van de gebruikte koolstofbron. Afhankelijk van groeicondities kunnen de effecten van mutaties sterk variëren. Standaardisering van groeicondities en de genetische achtergrond van een modelorganisme is daarom essentieel om goede conclusies te kunnen trekken. Daarbij is het van belang om inzicht te hebben in de omgevingsfactoren die de levensduur van een modelorganisme beperken.

Door de ontwikkeling van betere middelen voor genetische manipulatie van hogere modelorganismen, zoals wormen en vliegen, neemt de interesse voor gist als model in het onderzoek naar veroudering af. Gist blijft echter aantrekkelijk voor de bestudering van de onderliggende moleculaire mechanismen van mutaties die veroudering beïnvloeden. Bovendien is het gebruik van verschillende modelsystemen tegenwoordig ‘good practice’ om mechanismen te valideren.

De accumulatie van beschadigde celcomponenten is een belangrijk kenmerk van veroudering. Om dit te voorkomen zijn celcompartimenten, waaronder peroxisomen, uitgerust met systemen

die beschadigde componenten kunnen verwijderen (housekeeping). Tot nu toe is er relatief weinig bekend over het verwijderen van peroxisomale eiwitten en membraaneiwitten uit het organel dan over de synthese en transportroutes van nieuw gesynthetiseerde eiwitten. Recent onderzoek wijst uit dat het ubiquitine proteasoom systeem betrokken is bij het verwijderen van peroxisomale membraaneiwitten. Het is echter nog niet duidelijk hoe specifieke eiwitten worden gemerkt voor afbraak en hoe ze uit de membraan worden geëxtraheerd. Dit is een belangrijke richting voor toekomstig onderzoek.

In dit proefschrift laten we zien dat ROS geproduceerd in het peroxisoom ook buiten het organel actief kan zijn. Een belangrijke vraag is of een te hoge concentratie peroxisomaal ROS door een tekort aan antioxidant enzymen wordt gedetecteert en of dit vervolgens leidt tot aanpassing van de hoeveelheid antioxidante enzymen. Ook moet nog worden vastgesteld wat het doel is van peroxisomaal ROS binnen en buiten het organel. Tot slot is een intrigerende vraag hoe het ROS metabolisme is gekoppeld aan organel biogenese, proliferatie en afbraak van het organel. Recente data duiden erop dat verschillende eiwitten betrokken bij de vorming van peroxisomen (zoals Pex5 en Pex11) redox gevoelig zijn. De moleculaire details van een dergelijke regulatie zou inzicht kunnen geven in de dynamiek van dit fascinerende organel.



